

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-326193

(43) 公開日 平成11年(1999)11月26日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 21/27

識別記号

F I
G 0 1 N 21/27

C

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-136994

(22) 出願日 平成10年(1998) 5 月19日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地

(72) 発明者 竹井 弘之

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 坂本 健

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 高橋 明夫 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 センサおよびこれを利用した測定装置

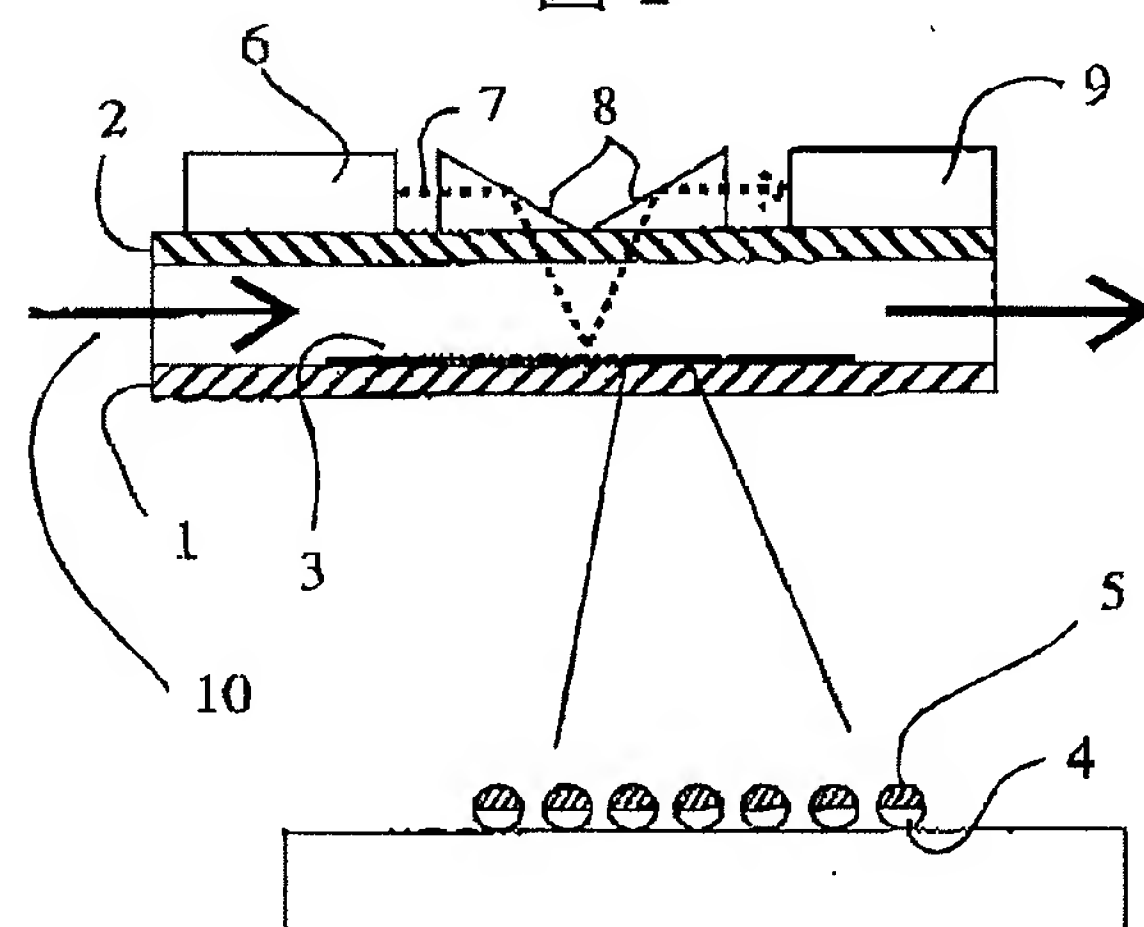
(57) 【要約】

【課題】 高感度なセンサ及び測定装置を提供する。

【解決手段】 金属表面に存在する金属微粒子の反射スペクトルが、周辺の誘電率に応じて敏感に変化する現象を利用する。

【効果】 高感度で、機械的な動作を必要としない簡素化されたセンサを構成できる。

図 1



(2)

特開平11-326193

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】平坦な基板、該基板上にほぼ均一に配列された高分子または非金属の絶縁体微小球層よりなり、該絶縁体微小球の基板と反対側の外面のほぼ半分の面上に薄い自由電子金属微粒子層を備えることを特徴とするセンサ。

【請求項2】前記高分子または非金属の絶縁体微小球層が粒径5nmから100μmの実質的に単一な径のポリスチレン、スチレン/ブタジエン、ポリビニルトルエン、スチレン/ジビニルベンゼン、ビニルトルエン/ターシャリーブチルスチレンなどの高分子またはシリコン、酸化シリコン、ガリウム、ガラスなどの非金属の絶縁体である球体で構成され、前記薄い自由電子金属微粒子層が1nmから100μm厚の金、銀、銅、アルミなどの自由電子金属微粒子層である請求項1記載のセンサ。

【請求項3】前記基板表面が自由電子金属層を持ち、該自由電子金属層表面がチオール、ジスルフィド、スルフィドなどの化学修飾をなされた後、前記粒径5nmから100μmの単一径のポリスチレン、スチレン/ブタジエン、ポリビニルトルエン、スチレン/ジビニルベンゼン、ビニルトルエン/ターシャリーブチルスチレンなどの高分子またはシリコン、酸化シリコン、ガリウム、ガラスなどの非金属の絶縁体微小球が前記自由電子金属層表面に吸着されたものである請求項1または2記載のセンサ。

【請求項4】平坦な基板、該基板上にほぼ均一に配列された高分子または非金属の絶縁体微小球層よりなり、該絶縁体微小球の基板と反対側の外面のほぼ半分の面上に薄い自由電子金属微粒子層を備えるセンサと、前記自由電子金属微粒子層に所定の角度で所定の光を照射するとともに前記自由電子金属微粒子層からの前記照射光の反射光を検出する光学系と、前記自由電子金属微粒子層にサンプルを供給する手段とよりなることを特徴とする測定装置。

【請求項5】前記照射光の反射光を検出する光学系が光のスペクトル変化を検出するものである請求項4記載の測定装置。

【請求項6】前記照射光の反射光を検出する光学系が反射率の変化を検出するものである請求項4記載の測定装置。

【請求項7】前記自由電子金属微粒子層が前記サンプル中の特定被検体と選択的に結合する分子で修飾された請求項4ないし6のいずれかに記載の測定装置。

【請求項8】前記自由電子金属微粒子層の修飾が前記特定被検体に対する選択的結合能を有する抗体、レセプタなどの蛋白質およびDNA等の核酸により行われた請求項7記載の測定装置。

【請求項9】平坦な基板、該基板上にほぼ均一に配列された高分子または非金属の絶縁体微小球層よりなり、該

絶縁体微小球の基板と反対側の外面のほぼ半分の面上に薄い自由電子金属微粒子層を備える独立した複数のセンサと、該独立した複数のセンサのそれぞれに前記自由電子金属微粒子層に所定の角度で所定の光を照射するとともに前記自由電子金属微粒子層からの前記照射光の反射光を検出する複数の独立した光学系と、前記独立した複数のセンサの自由電子金属微粒子層にサンプルを供給する独立した複数の手段とよりなり、前記センサと光学系とは分離可能な構成とされたことを特徴とする測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面プラズモン現象を利用した免疫診断センサ、ガスセンサ、イオンセンサおよびこれを利用した測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来のこの種のセンサとしては、表面プラズモン共鳴法を利用したセンサが挙げられる。表面プラズモンとは、金属薄膜と誘電体の界面を伝播する自由電子の疎密波であり、界面における誘電率に大きく影響されることから、免疫センサ、ガスセンサなど検出原理に用いられている。このセンサを応用した測定装置の具体的な構造例を図2に示す。プリズムなどの透明な高屈折率媒体20の表面に約50nmの金もしくは銀などの自由電子金属の薄膜21を形成し、薄膜21の他の面は分子認識層29とされている。薄膜21の表面プラズモンを励起するためにプリズム側からp偏光の単色の平行光22を光源23から照射する。全反射する条件のもとで入射角度24を変化させながら、正反射光25を検出器26で検出することにより、表面プラズモンの励起が確認できる。すなわち、分子認識層29に存在する分子に応じた表面プラズモンが励起される共鳴角度27においては、入射光のエネルギーが表面プラズモン励起に消費されるため、反射光の強度28が極度に減少する。分子認識層29に存在する分子が異なるときには、たとえば、共鳴角度30において反射光の強度31が極度に減少する。共鳴角度は界面から数100nm以内の領域における誘電率に敏感に依存することから、共鳴角度を知ることにより金属表面に存在する分子認識層29に存在する分子の誘電率を特定することができるからセンサとして利用できる。たとえば、薄膜21の表面に特定の分子を認識して分子結合をする構造を作っておき、その表面にサンプルを流す構成の測定装置を構成すれば、サンプル中に特定の分子が含まれていれば誘電率が変化するから、その分子に対応する反射角での反射光を監視していれば直ちに特定の分子が分子認識層29に捕らえられたことを知ることができる。

【0003】表面プラズモンを利用する方法としては、上記の単色平行光を用いる方法以外にも、(1)角度分布を有する単色光を照射し、反射光を光センサアレー

3

検出する方法や(2)白色平行光を照射し、反射光を分光する方法などもあるが、いずれにしても一定波長の光に対する共鳴角度が、界面の誘電率に応じて変化することを利用している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術において、表面プラズモンセンサを利用した測定装置において、共鳴角度を測定するには、照射光の光源、金属薄膜、光検出器の位置関係を精度良く保持し、かつ駆動する必要がある。測定精度を向上するには、金属薄膜と光検出器の距離を大きく取ることが望ましいが、小型化とは相容れない。また、表面プラズモン共鳴方法は温度に敏感であるため、装置全体の温度制御もしくは温度補正などが必要であり、やはり小型化には不向きである。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、発明者らが最近発見した金薄膜と金微粒子の表面プラズモンの相互作用に由来すると考えられる発色現象を利用するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】図3(a)に示す様に、透明基板40の上に、金、銀、銅、アルミなどの金属を蒸着することにより厚さ5nmから1000nmの金属薄膜41を形成する。次に、(b)に示す様に、金属薄膜41を10mMの2-アミノエタンチオールやチオグリコレートなどのチオール分子溶液によって処理し、その表面に修飾膜層42を形成する。次に、(c)に示す様に、1から50mMのカルボジイミド液に懸濁された粒径5nmから100μmのポリスチレン微小球43を前記金属薄膜41に加えると、1層以下の微小球層44が金属薄膜表面に形成される。次いで、(d)に示す様に、乾燥後さらに、金を厚さ5nmから500nm蒸着すると、ポリスチレン微小球の上に帽子状の金微粒子45が形成される(特願平9-148935)。金微粒子が形成されたことにより、基板が顕著な発色を示す様になる(特願平9-148941)。この発色現象は、白色光が基板に対して一定角度で照射され基板表面において反射される際に、一部の波長帯域の光が吸収されることにより生じる半面、透過光に対しては波長依存性がないため発色特性は観測されない。これは、次の様に金薄膜と金微粒子の表面プラズモンの相互作用に由来すると考えられる。

【0007】通常の真球状金微粒子を白色光で照射すると、微粒子中の自由電子の集団的振動である表面プラズモンが励起される。金薄膜における表面プラズモンとは異なる分散関係を有し、伝播しないことから局所的表面プラズモンと呼ばれる。共鳴波長は、微粒子の粒径と形状に依存し(Surface Science, 156, 678, 1985)、さらに金微粒子を金薄膜の近傍に形成すると、薄膜の表面プラズモンと微粒子の局所的表面プラズモンが相互作用を及ぼすこととなり、金微

(3)

特開平11-326193

4

粒子と金薄膜の複合体として新たな吸収特性を有することになる。平行化された白色光を一定角度で照射し、反射光を積分球内で測定することにより得られた吸収スペクトルは紫外、可視光、赤外波長の範囲において顕著な吸収ピークを有し、前記吸収ピークの波長は、基板上の金属の種類と厚さ、ポリスチレン微小球の粒径と吸着密度、ポリスチレン微小球の上に蒸着される金属の種類と厚さに顕著に依存する。例えば、粒径が55、110、152、209nmのポリスチレン微小球に対して、金を厚さ20nm蒸着すると、図4に示す反射スペクトルを有するサンプルが得られる。

【0008】微粒子の吸収スペクトルが、界面から粒径の数分の一以内の領域における誘電率に依存することは公知である。吸収ピークの波長が可視領域に存在する場合、周囲の誘電率が変化すると色が変化することを利用した生体分子検出方法が知られている(Science, 277, 1078, 1997)。

【0009】さて、本発明においては金微粒子が金薄膜上に固相化されていて、金微粒子の局所的表面プラズモンと金薄膜の表面プラズモンが相互作用することから、微粒子と薄膜の間に入射光に比べて数桁強力な電場が存在することを示唆する計算結果がある(J. Vac. Sci. Technol., 9, 510, 1991.)。これら計算においては、微粒子の形状が真球として扱われているが、同様な結果は帽子状微粒子にもあてはまると考えられ、増大電場中において誘電率が変化することにより、吸収スペクトルが大きく変化する。一例として、空気中におけるスペクトルと水中におけるスペクトルの測定結果を図5に示す。粒径200nmのポリスチレン微小球に、厚さ20nmに金を蒸着した試料において、空気とは異なる誘電率を有する水で表面領域を置換することにより、吸収極大値が波長800nmから870nmに移動するのが分かる。スペクトルの変化は迅速および可逆的であり、表面から数nmから数100nmにおける領域における誘電率の変化に依存する。ちなみに、粒径200nmのスペクトルが図4と図5とで多少異なるのは、測定条件の違いを反映している。

【0010】実施例1

本発明の測定装置の一実施例を図1に示す。金属表面1と透明基板2とを対向して配置した流路を備え、前記金属表面1の上にはポリスチレン微小球と金微粒子の複合体3からなる面が形成されている。複合体3は図3で説明した手順で作られた粒径が5nmから100μmのポリスチレン微小球4の上に金5が厚さ5nmから1000nmに蒸着された形態を取る。複合体3の表面にさまざまな修飾を施すことが可能であり、修飾の例を図6に示す。(a)は複合体3が抗体60で修飾されている場合、(b)は複合体3が核酸61で修飾されている場合、(c)は複合体3がゼオライト62で修飾されている場合、(d)は複合体3が陽イオン交換体63、もし

10

20

30

40

50

(4)

特開平11-326193

5

くは陰イオン交換体64で修飾されている場合である。それぞれの場合、光源6から放射される単色光7は、光学系8により流路内に導かれ、複合体3の表面で反射され、光学系8により検出器9により検出される。流路に導入されたサンプル10中に複合体3の表面の修飾に対応する被検体を含んでいると、これが選択的に吸着される。反射される単色光7の反射率は複合体3の表面状態に応じて敏感に変化するため、被検体の存在を検出できる。

【0011】実施例2

本発明の他の実施例を図7に示す。金属表面70が上下面の両方に備えられた流路71を有する。流路71の上下の金属表面70上にはポリスチレン微小球と金微粒子の複合体72が形成されている。複合体72の表面にさまざまな修飾を施すことが可能であり、修飾の例は前述した図6と同じものとできる。本実施例の場合、光源73から放射される単色光74は、光学系75により、透明窓76を介して金属表面70上の複合体72に導かれ、上下の複合体72で多重反射した後、透明窓77を通り、光学系75により検出器78に導かれ検出される。流路に導入されたサンプル79中に複合体72の表面の修飾に対応する被検体を含んでいると、これが選択的に吸着される。反射される単色光74の反射率は複合体72の表面状態に応じて敏感に変化するため、被検体の存在を検出できる。

【0012】実施例3

本発明の他の実施例を図8に示す。装置は、光源80、センシングヘッド81、両者を結合する光ファイバー84、該光ファイバー84にカップラー82を介して結合された検出器83から構成される。センシングヘッド81は光ファイバー84先端に嵌合される中空部を持ったチャンバーであり、チャンバー中空部の内部表面86には、ポリスチレンと金微粒子の複合体85が形成されている。複合体85には、光ファイバー84を通して光源80から伝播する光が照射され、複合体85によって反射光88として反射される。反射光88はカップラー82により検出器83に導かれ、検出される。チャンバーにはサンプル導入用の穴89が設けられている。複合体85の表面にさまざまな修飾を施すことが可能なことは先の実施例と同様であり、穴89から導入されたサンプルに含まれる被検体が複合体85の修飾に応じて表面に吸着できる様になっている。複合体85の表面で吸着が生じると、単色光88の反射率は敏感に変化するため、被検体90の存在を検出できる。

【0013】本実施例は、ファイバを使用し、ファイバを狭い検出場所にも挿入できるので、多様な用途が期待できる。また、生体に対する内視鏡91にセンシングヘッド81を装着して、検査装置とすることも可能である。

【0014】実施例4

6

本発明の他の実施例を図10および図9により説明する。平坦なシリコン基板100の上に、まず蒸着により厚さ5nmから1000nmの金薄膜を形成した。金薄膜の表面を親水性にするために、チオグリコール酸ナトリウムの様にカルボン酸、または2-アミノエタノールの様にアミノ基を有するチオール溶液（濃度0.01mMから1M）で金薄膜93を1分以上処理して、チオール分子層で化学修飾した。次に、基板100に濃度0.01mMから1Mのカルボジイミド溶液に懸濁された粒径5nmから100μmのポリスチレン微小球を表面に添加することにより、金薄膜表面にポリスチレン微小球の層を一層形成する際、異なる領域101、102、103および104ごとに異なる粒径のポリスチレン微小球を吸着した。次に、吸着させたポリスチレン微小球に金を厚さ5nmから100nm蒸着して金微粒子を形成した。

【0015】前記金微粒子の表面を修飾する方法として、チオール分子と金の間の共役結合を利用した。図9に示す様に、金表面93をアミノエタノールの様なアミノ基を有するチオール分子94の10mM水溶液に浸すことにより、金表面93をアミノ基で修飾した。次にN-ヒドロキシスクシンイミドで活性化されたカルボニル炭素で修飾されたビオチン95をpH7から9の緩衝液に懸濁し、前記のアミノ基で修飾された金微粒子に加えることにより、前記カルボニル炭素とアミノ基の間にペプチド結合が形成され、金微粒子の表面をビオチンで修飾できる。ビオチンに対して4個所の結合領域を有するアビジンまたはストレプトアビジン96を介して、前記のビオチン修飾化金微粒子の表面に、ビオチン修飾化された蛋白質、リガンド、DNAなどの任意の生体分子97を結合することが可能である。これらの表面修飾により、例として、領域102にはリガンド105で修飾されたポリスチレン微小球106が形成され、領域101には抗体107で修飾されたポリスチレン微小球108が形成された様子を図10(b)に示す。

【0016】シリコン基板100は、光源109により一定角度から照射される。コリメータ110により平行化された白色光111が正反射され、光学系112で集光され、回折格子113により分光され、検出器114で検出される。シリコン基板100の上に被検体115を含む液体が導入され、被検体115が、例として領域101の抗体107に選択的に結合すると、領域101に固有の吸収ピーク116のみの波長が変化するため、スペクトル変化をモニタすることにより、検体115の同定が可能となる。

【0017】実施例5

本発明の他の実施例を図11(a)、(b)に示す。本実施例の基本的な構成は図1で説明したものと同一であるが、大量のサンプルを測定する際、サンプル間のコンタミネーションを排除するために、(a)に示すよう

10

20

30

40

50

7

に、センサ部分と光学的検出部分とを分離できるようにするとともにセンサ部分を着脱自在の構造として、容易に交換できるものとしてある。

【0018】前記センサ部分は、金微粒子とポリスチレン微小球の複合体130が微細流路131の内部に形成されていて、マイクロキャピラリー132が挿入してある。前記光学的検出部分は、光源133、光学系135および光検出器134の他に、前記センサ部分をこの光学系に結合させるための構造部分から構成される。センサ部分を光学的検出部分の結合穴136に挿入すると、光源133からの光が、センサ部分の光学窓137を通り、複合体130が照射され、この反射光は光検出器134により検出される。前記光学的検出部分は、またサンプルの吸引機構を備えている。すなわち、前記結合穴136はチャンバ138と連通している。チャンバ138にはピエゾ素子139が貼り付けられており、前記ピエゾ素子139にパルス電圧を印加して、チャンバ138の内部容積を急減させた後元に戻すことによりチャンバ138内部をパルスの減圧し、センサ部分に外部からサンプルを吸引することができる。

【0019】図11(b)に示すように、センサ部分143および光学的検出部分144に示すように複数チャンネル構成とし、サンプル穴141には複数の種類のサンプル142を同時に吸引し計測するものとすることができる。この構成では、センサ部分143をサンプル毎に交換してしまえばサンプル間のコンタミによる誤差は容易に防止できる。

【0020】

【発明の効果】本発明により、被検体の有無を高感度で検出できる簡便なセンサ及び検出装置を提供できた。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の測定装置の一実施例を示す断面図。

【図2】従来技術の装置構成および原理を示す図。

【図3】本発明のセンサである金属薄膜上に金属微粒子を形成する手順の例を示す図。

【図4】異なる粒径の高分子微小球を用いて調製した試料の反射スペクトルの例を示す図。

【図5】金微粒子表面の誘電率に依存する反射スペクトルの例を示す図。

【図6】本発明のセンサである金微粒子の表面修飾をの例を示す図。

【図7】本発明の測定装置の他の実施例を示す断面図。

【図8】本発明の測定装置の他の実施例を示す断面図。

【図9】金とチオール分子の結合を利用して、金表面を

(5)

特開平11-326193

8

生体分子で修飾する方法の例を示す図。

【図10】本発明の測定装置の他の実施例を示す断面図。

【図11】本発明の測定装置の他の実施例を示す断面図。

【符号の説明】

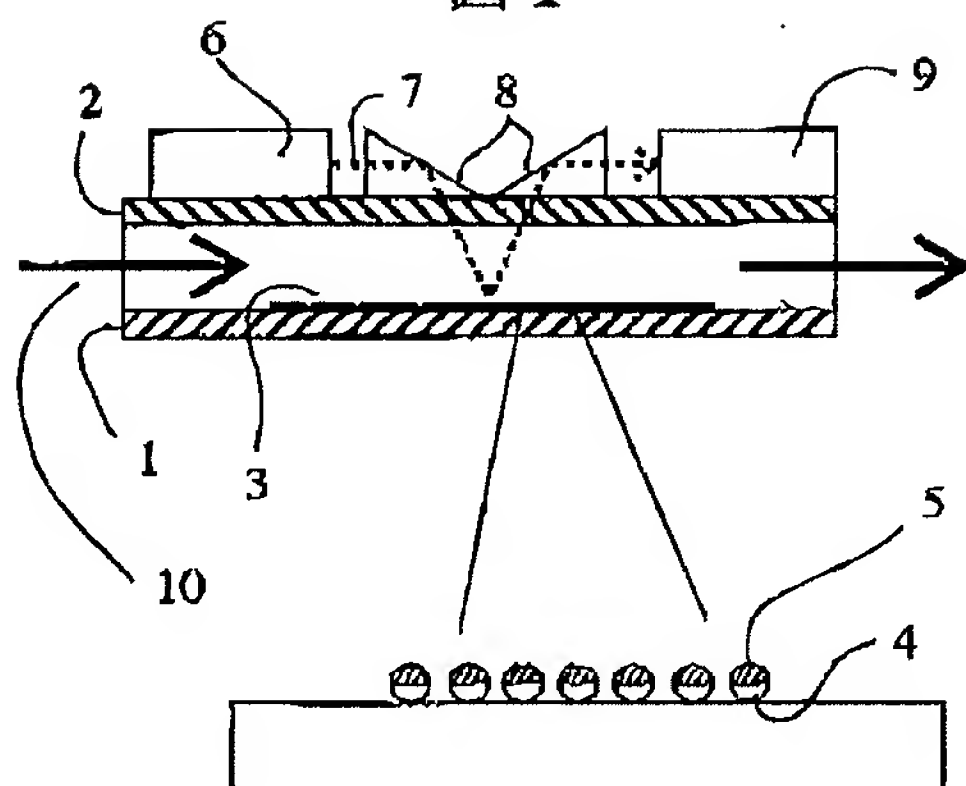
1：金属表面、2：透明基板、3：ポリスチレンと金微粒子の複合体、4：ポリスチレン微小球、5：金、6：光源、7：単色光、8：光学系、9：検出器、10：被検体、20：高屈折率担体、21：自由電子金属の薄膜、22：単色の平行光、23：光源、24：入射光、25：正反射光、26：検出器、27：共鳴角度、28：反射光の強度、29：分子認識層、30：新しい共鳴角度、31：新しい反射光の強度、40：透明基板、41：金属薄膜、42：修飾膜層、43：ポリスチレン微小球、44：微小球層、45：帽子状の金微粒子、60：抗体、61：核酸、62：ゼオライト、63：陽イオン交換体、64：陰イオン交換体、70：金属表面、71：流路、72：ポリスチレンと金微粒子の複合体、73：光源、74：単色光、75：光学系、76：透明窓、77：透明窓、78：検出器、79：被検体、80：光源、81：センシングヘッド、82：カップラー、83：検出器、84：光ファイバー、85：ポリスチレンと金微粒子の複合体、86：内部表面、87：チャンバー、88：光、89：穴、90：被検体、91：内視鏡、93：金表面、94：アミノ基を有するチオール分子、95：ビオチン、96：アビジンおよびストレプトアビジン、97：生体分子、100：シリコン基板、101、102、103、104：異なる領域、105：リガンド、106：ポリスチレン微小球、107：抗体、108：ポリスチレン微小球、109：光源、110：コリメータ、111：白色光、112：光学系、113：回折格子、114：検出器、115：被検体、116：領域101に固有な吸収ピーク、117：領域102に固有な吸収ピーク、118：領域103に固有な吸収ピーク、119：領域104に固有な吸収ピーク、130：金微粒子とポリスチレン微小球の複合体、131：微細流路、132：マイクロキャピラリー、133：光源、134：光検出器、135：光学系、136：結合穴、137：光学窓、138：チャンバ、139：ピエゾ素子、140：リング、141：サンプル穴、142：サンプル、143：センサ部分、144：光学的検出部分。

(6)

特開平 1 1 - 3 2 6 1 9 3

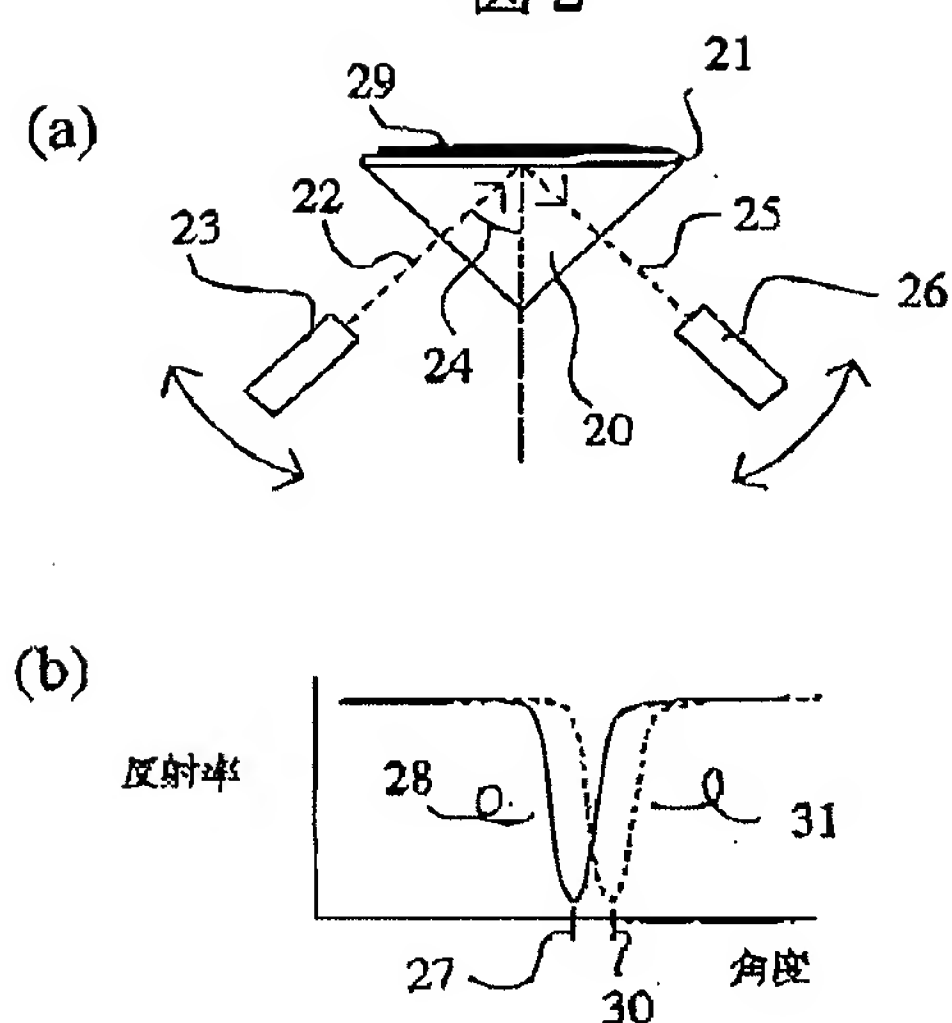
【图 1】

图 1



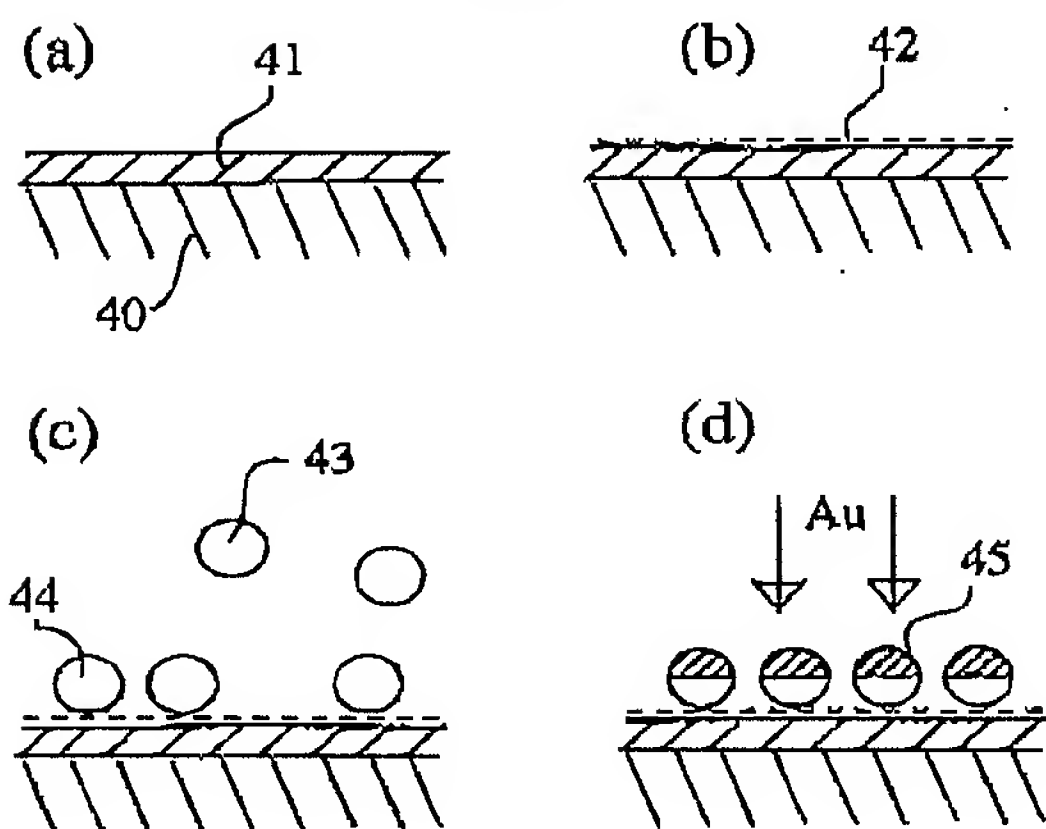
【图2】

图 2

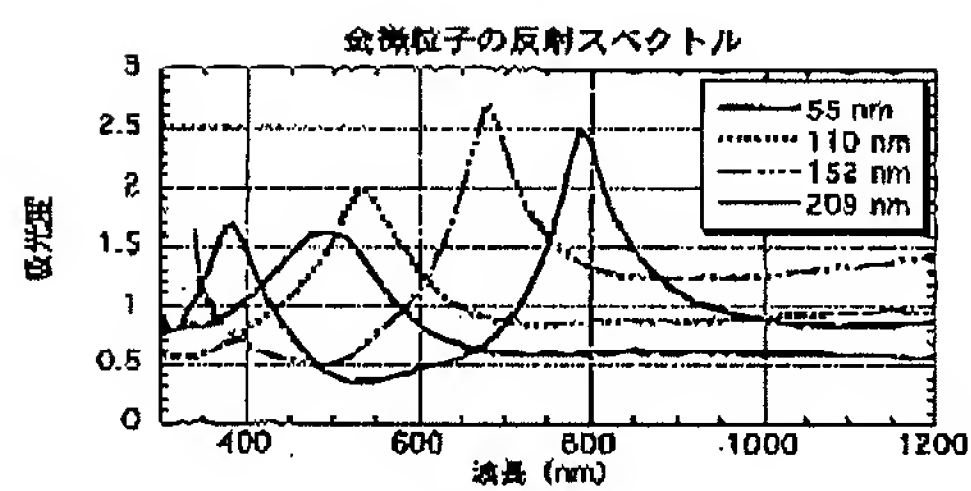


【図 3】

图 3

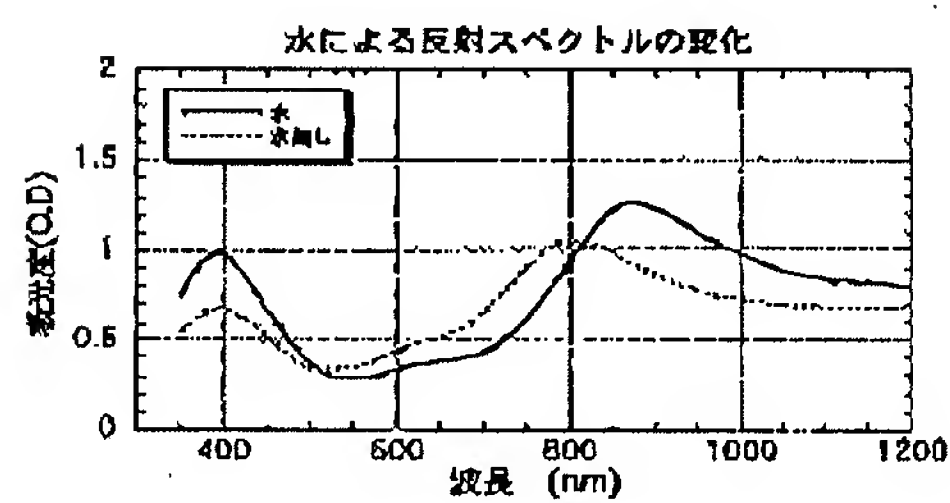


【图 4】



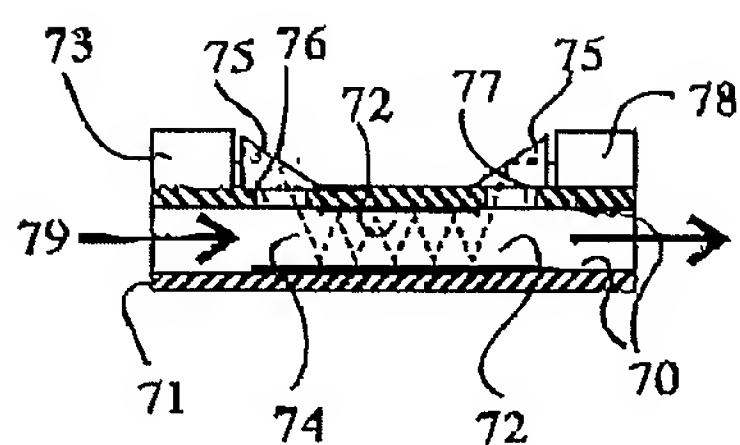
【图 5】

图 5



【例 7】

Figure 7 shows a schematic diagram of a rectangular structure. It consists of a central vertical line and two horizontal lines, one above and one below the center. The horizontal lines are labeled 'a' and the vertical line is labeled 'b'.

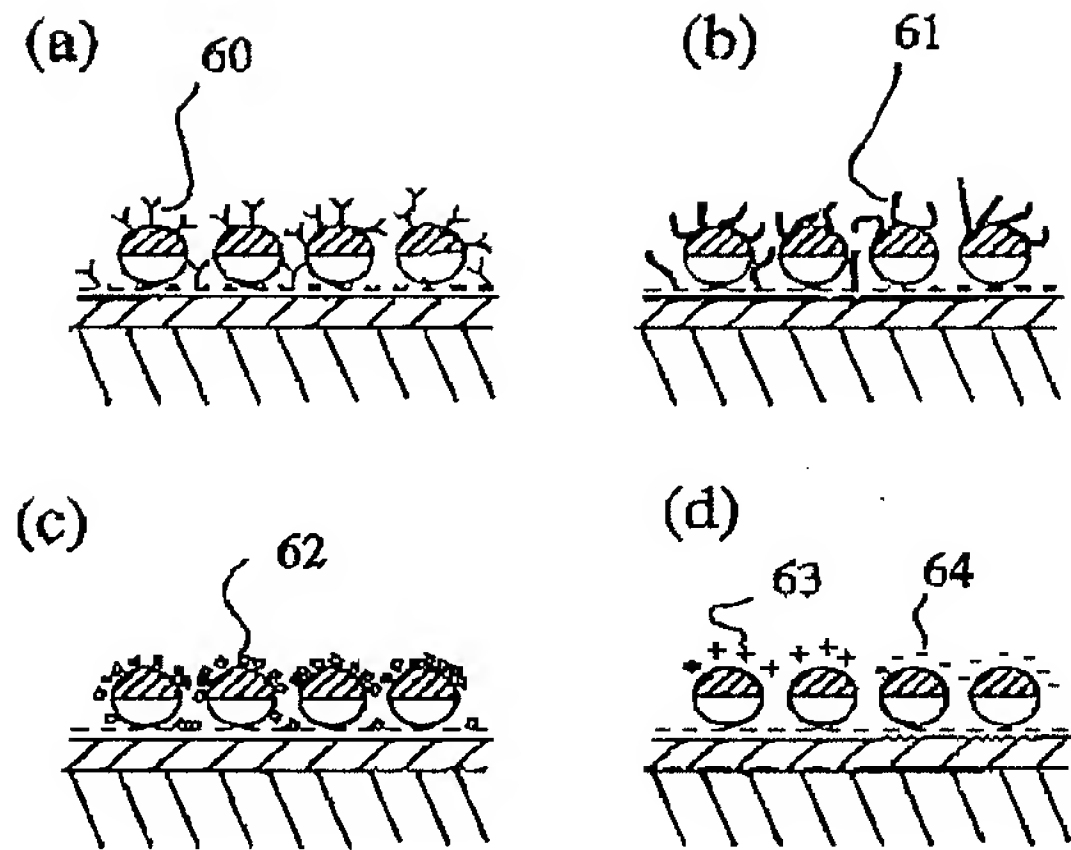


(7)

特開平 11-326193

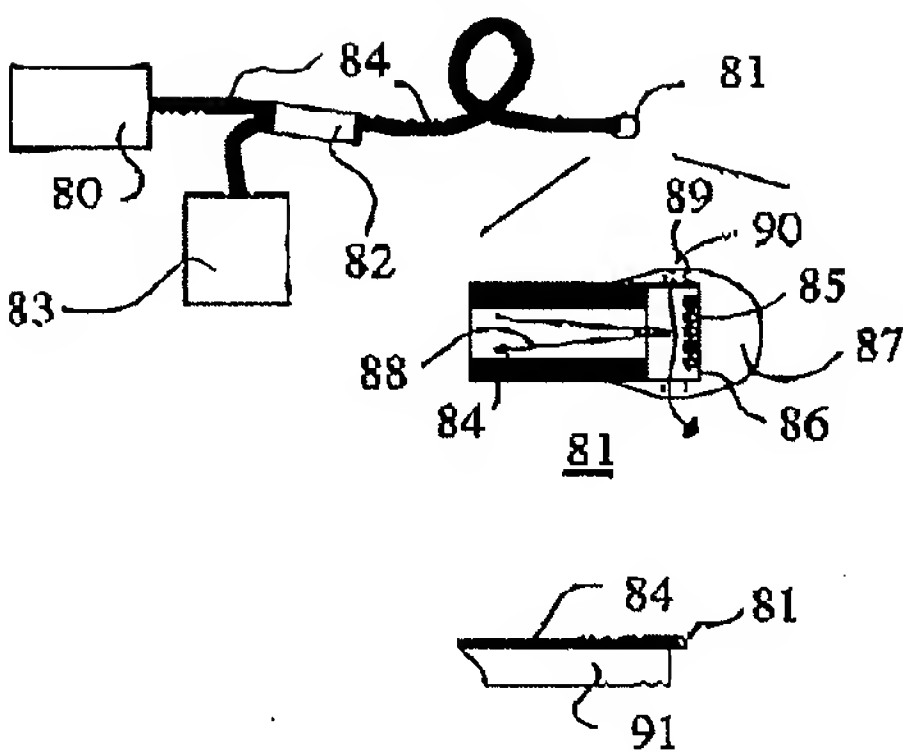
【図6】

図 6



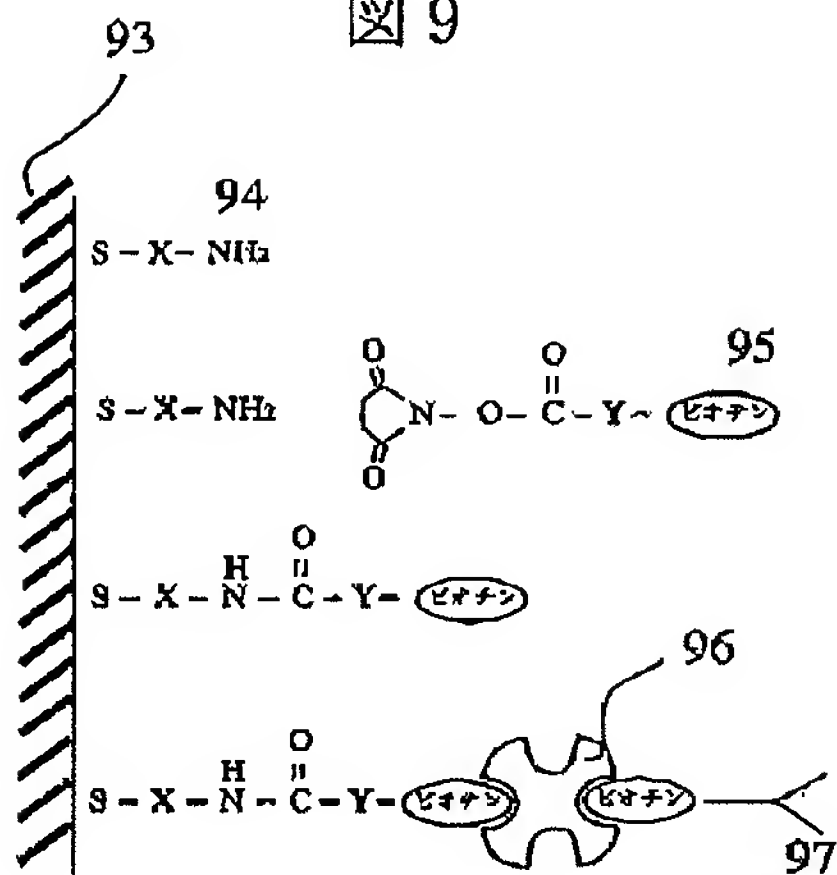
【図8】

図 8



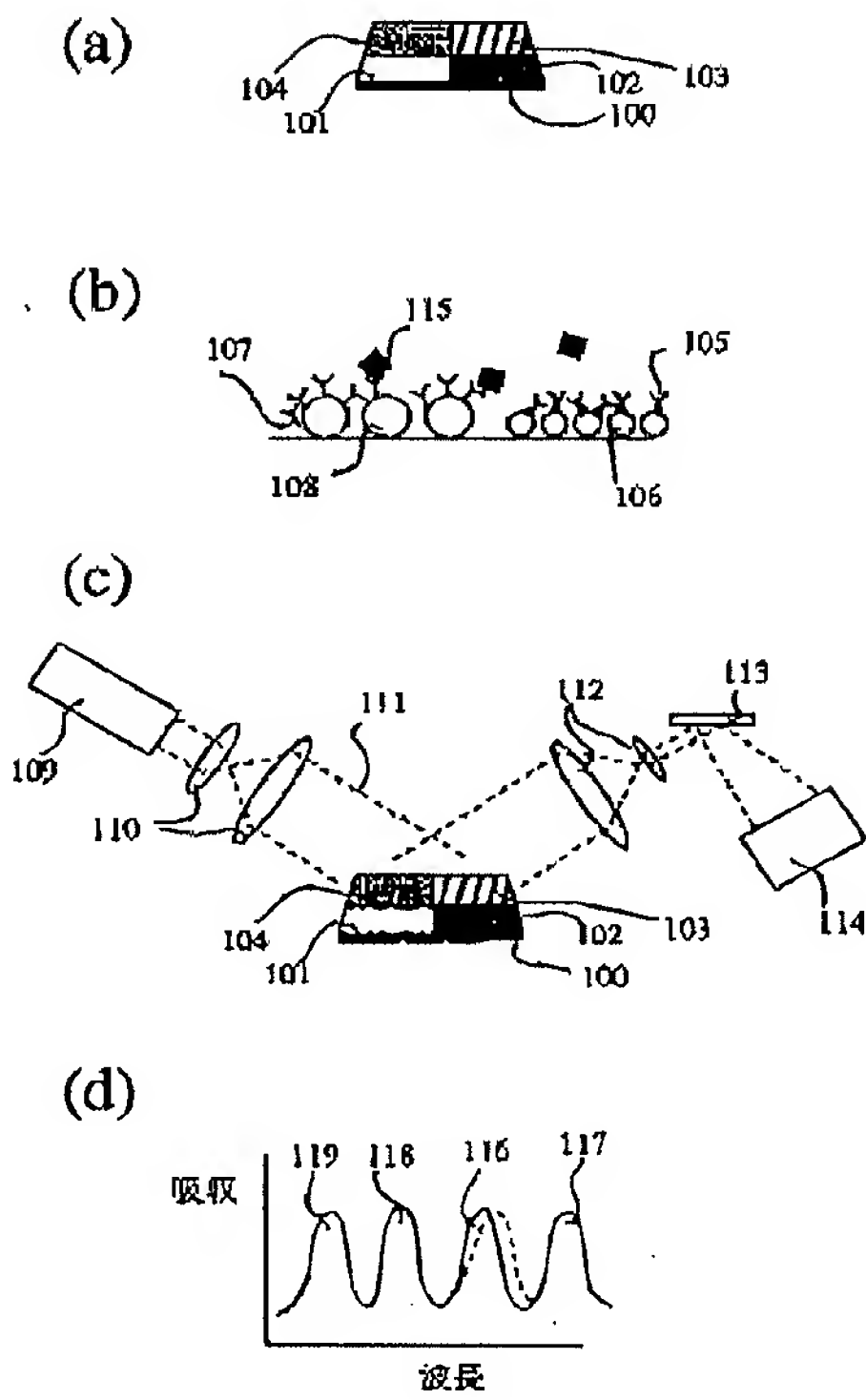
【図9】

図 9



【図10】

図 10



(8)

特開平 1 1 - 3 2 6 1 9 3

【図 1 1】

図 1 1

